

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 7 月 8 日 (08.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/056351 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/122, A61P 35/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016386

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 19 日 (19.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-370911
2002 年 12 月 20 日 (20.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川 4-6-1 O Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大塚 基之 (OTSUKA, Motoyuki) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区本

郷七丁目 3-1 東京大学医学部内 Tokyo (JP). 小俣 政男 (OMATA, Masao) [JP/JP]; 〒113-0033 東京都文京区本郷 7 丁目 3-1 東京大学医学部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒106-6123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

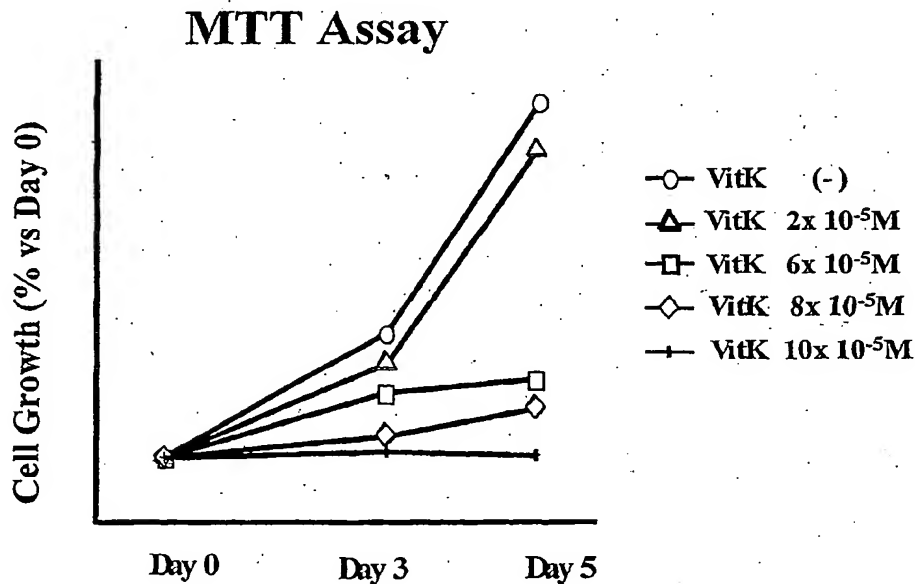
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ

[続葉有]

(54) Title: PKA ACTIVITY REGULATOR

(54) 発明の名称: PKA 活性調節剤



(57) Abstract: A PKA activity regulator which contains, as the active ingredient, menatetrenone or its salt. This PKA activity regulator is useful in producing a preventive or a remedy for cancerous diseases, a cancer cell proliferation inhibitor, a cancer cell infiltration inhibitor and AP-2, CREB and USF-1 activators. Moreover, it is intended to provide a method of regulating PKA activity characterized by comprising administering an effective dose of menatetrenone or its salt to a subject.

[続葉有]

WO 2004/056351 A1



パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約: 本発明に係る PKA 活性調節剤は、メナテトレノンまたはその塩を有効成分として含むものである。また、本発明に係る PKA 活性化剤は、癌疾患の予防又は治療剤、癌細胞増殖抑制剤、癌細胞浸潤抑制剤、並びに AP-2, CREB, 及び USF-1 の活性化剤を製造する際に有用である。さらに、本発明は、メナテトレノンまたはその塩を対象物に有効量投与することの特徴とする PKA 活性の調節法を提供するものである。

明 細 書

P K A 活性調節剤

技術分野

- 5 本発明は、メナトレノンまたはその塩を有効成分として含む、cAMP dependent protein kinase A(以下、単に「P K A」という。)活性調節剤等に関する。

背景技術

- 10 肝細胞癌 (H C C : hepatocellular carcinoma) 患者は、高率に門脈浸潤 (P V I : Portal Venous Invasion) をきたすことが知られており、一旦 P V I が発生すると予後は極めて不良である。H C C 患者における Des- γ -Carboxy Prothrombin (以下、「D C P」と称する。)の高値が、その後の P V I 進展と密接に関連することが知られている (たとえば、非特許文献 1 参照)。ここで、D C P とは、正常な凝固活性を
- 15 持たないプロトロンビンで、ビタミン K (以下、「V K」と称する。)が欠乏した状況で増えることが知られており、V K の欠乏・V K の吸収障害のマーカーとして用いられるタンパク質である。

- 一方で、D C P 高値 H C C 患者に対し V K を投与すると血清の D C P
- 20 値が低下すること (たとえば、非特許文献 2 参照)、in vitro で D C P 産生の H C C cell line に対し V K - I I を投与することで細胞の増殖が抑制されること (たとえば、非特許文献 3 参照) が報告されている。

- 肝癌に関する臨床的な研究としては、非環式 retinoid による肝癌再発抑止 (たとえば、非特許文献 4 参照)、ACE inhibitor (たとえば、非特許
- 25 文献 5 参照) や COX2 inhibitor (たとえば、非特許文献 6 参照) による肝癌抑制・肝癌細胞増殖抑制やアポトーシス促進作用が知られている。

他方、ビタミンK₂が、白血病細胞やMDS細胞(たとえば、非特許文献7参照)、乳癌細胞(たとえば、非特許文献8参照)、線維芽細胞(たとえば、非特許文献9参照)等における癌細胞の増殖を抑制することが報告されている。

- 5 しかしながら、より癌細胞増殖抑制作用ないしは癌細胞浸潤抑制作用に優れた、有用な癌疾患治療剤は未だ提供されていなかった。

[非特許文献1] Koike Y, Cancer 2001; 91: 561-9

[非特許文献2] Cancer 1992; 69: 31-8

[非特許文献3] Wang Z, Hepatology 1995; 22: 876-82

- 10 [非特許文献4] Muto Y, N Engl J Med 1996; 334: 1561-7

[非特許文献5] Yoshiji H, Clin Cancer Res 2001; 7: 1073-8

[非特許文献6] Kern MA, Hepatology 2002; 36: 885-94

[非特許文献7] Miyazawa K, Leukemia 2001; 15: 1111-7

[非特許文献8] Kar S, J Cell Physiol 2000; 185: 386-93

- 15 [非特許文献9] Li N, J Cell Physiol 1998; 175: 359-69

発明の開示

そこで、本発明は、癌疾患治療に有用な、PKA活性調節剤を提供することを目的とする。

- 20 本発明者らは、上記事情に鑑み、PKA活性調節剤を鋭意研究した結果、ビタミンK₂(メナテトレノンまたはその塩)がPKAを調節すること、ビタミンK₂がPKAを活性化すること、ビタミンK₂がPKAを活性化することにより、転写因子CRE/CREB, USF-1, AP-2の系が活性化されること、ビタミンK₂がPKA活性化することにより肝癌細胞の
- 25 増殖抑制作用及び浸潤抑制作用がもたらされること、を見出した。すなわち、肝癌細胞の増殖抑制作用及び浸潤抑制作用の機序としてPKA活

性化が介在するという知見を得て、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

[1] メナテトレノンまたはその塩を有効成分として含む、PKA活性調節剤と、

5 [2] メナテトレノンまたはその塩を有効成分として含む、PKA活性化剤と、

[3] メナテトレノンまたはその塩を有効成分とするPKA活性化剤を含む、癌疾患の予防又は治療剤と、

10 [4] メナテトレノンまたはその塩を有効成分とするPKA活性化剤を含む、癌細胞増殖抑制剤と、

[5] メナテトレノンまたはその塩を有効成分とするPKA活性化剤を含む、癌細胞浸潤抑制剤と、

[6] 癌疾患の予防又は治療に用いられる、上記[2]記載のPKA活性化剤と、

15 [7] メナテトレノンまたはその塩を有効成分とするPKA活性化剤を含む、AP-2, CREB, 及びUSF-1の活性化剤と、

[8] メナテトレノンまたはその塩を有効成分として含む、PKA活性の変化に由来する疾患の予防又は治療剤と、

20 [9] メナテトレノンまたはその塩を対象物に有効量投与することを特徴とする、PKA活性の調節法と、

[10] PKA活性化剤の製造のための、メナテトレノンまたはその塩の使用と、

[11] メナテトレノンまたはその塩を有効成分とするPKA活性化剤を、癌患者に投与するための医薬品キット、を提供する。

25

図面の簡単な説明

図 1 は、肝癌細胞の増殖抑制に対するビタミン K 2 添加の効果を示したグラフである。

図 2 は、細胞周期に対するビタミン K 2 添加の効果を示したチャートである。

5 図 3 は、細胞の浸潤能に対するビタミン K 2 の効果を示したゲル写真である。

図 4 は、ビタミン K 2 添加による遺伝子発現変化を示した (a) グラフ、(b) 解析チャート写真である。

10 図 5 は、ビタミン K 2 添加による遺伝子発現量変化を示した R T - P C R による解析チャート写真である。

図 6 は、ビタミン K 2 添加による遺伝子発現の経時的変化を示した図である。

図 7 は、遺伝子ネットワークを示す図である。

15 図 8 は、ビタミン K 2 添加による蛋白質発現変化を示した (a) 解析写真、(b) グラフである。

図 9 は、ビタミン K 2 添加によるシグナル伝達経路の活性化を示した解析写真である。

図 10 は、ビタミン K 2 添加によるシグナル伝達経路 (AP-2) の活性化を示した解析写真である。

20 図 11 は、ビタミン K 2 添加によるシグナル伝達経路 (CREB) の活性化を示した解析写真である。

図 12 は、ビタミン K 2 添加による P K A の活性化を示した解析写真である。

25 図 13 は、P K A inhibitor によるビタミン K 2 の細胞増殖抑制作用の阻害を示すグラフである。

図 14 は、ビタミン K 2 添加による Rho の活性化の抑制を示す解析写

真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこ
5 れらに限定されるものではない。

本発明において用いるメナテトレノン、好ましくはメナキノン-1
~14であり、より好ましくはメナキノン4~8であり、さらに好まし
くはメナキノン-4である。

本発明において、癌疾患としては、肝癌等が挙げられる。慢性肝炎、
10 肝硬変からは高率に肝癌が発癌し、いったん発癌するとさらに高率に再
発する。例えば、C型肝炎やB型肝炎から肝硬変となり、腫瘍切除後、
再発するケースがある。本発明に係るPKA調節剤によれば、このよう
な肝癌治療後の予後を極めて有効に改善（再発の予防又は治療）するこ
とができる。また、予後不良な肝癌の再発形態の一つであるPVIの発
15 生を極めて有効に抑制することができる。

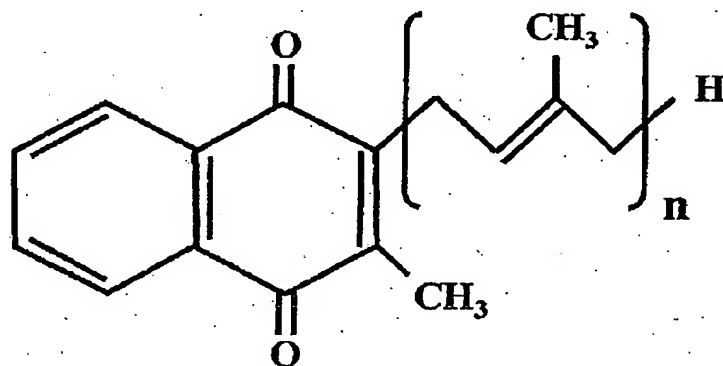
また、本発明において、PKA活性の変化に由来する疾患としては、
白血病、膀胱癌、卵巣癌などが挙げられる。

PKA (cAMP dependent protein kinase A) は、Epidermal Growth
Factor(EGF)などの種々の刺激によって細胞内濃度が高まったcAMPが、
20 PKAの regulatory subunit に結合することでPKAの catalytic
subunit が遊離しはじめて活性を出す分子として知られている (Walsh
DA, FASEB J 1994 ;8:1227-36)。活性化されたPKAは下流のシグナ
ル分子を活性化してさまざまな作用を細胞にもたらすが、細胞増殖の観
点からPKAを見ると、活性化されたPKAは細胞の増殖に促進的に関
25 わるという報告もあるのに対し、活性化PKAは癌細胞の増殖を抑える
という報告もある (van Oirschot BA, J Biol Chem 2001;276:33854-60

他)。

細胞内では様々な転写因子が働いて多くの遺伝子発現に寄与しているが、PKAは活性化されると cAMP Response Element(CRE)に結合する転写因子である CRE Binding Protein(CREB)をリン酸化することで転写を活性化し、下流の遺伝子発現を調節していることが知られている。PKAが制御している転写因子には USF-1(Xiao Q, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002 ;283:H213-9)、AP-2(Garcia MA, FEBS Lett 1999 ;444:27-31) など他にも多くのものが報告されており、その下流のシグナル伝達系の制御は極めて複雑なものと考えられる。

メナテトレノン、ビタミンK₂とも称され、イソプレニル基の数 n によってメナキノン- n (MK- n) とも呼ばれる。2-メチル-1,4-ナフトキノン環の3位にイソプレニル基を持つ物質をビタミンK₂ (VitaminK₂) と総称する。ビタミンK₂ にはイソプレニル基の数の違いによる同族体がある。メナテトレノンの構造式を以下に示す。



式中、 n は、好ましくは 1～14 であり、より好ましくは 4～8 である。特に n が 4 である、2-メチル-3-テトラプレニル-1,4-ナフトキノン (2-methyl-3-tetraprenyl-1,4-naphthoquinone ; MK-4)

が好ましい。

メナテトレノンは黄色の結晶又は油状の物質で、におい及び味はなく、光により分解しやすい。また、水にはほとんど溶けない。メナテトレノン(ビタミンK₂)の薬理作用は、血液凝固因子(プロトロンビン、VII、IX、X)のタンパク合成過程で、グルタミン酸残基が生理活性を有するγ-カルボキシグルタミン酸に変換する際のカルボキシル化反応に関与するものであり、正常プロトロンビン等の肝合成を促進し、生体の止血機構を賦活して生理的に止血作用を発現するものである。

本発明に係る医薬の有効成分であるメナテトレノンは、塩を形成していてもよく、かかる塩における好ましい例としては、ハロゲン化水素酸塩(例：フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩等)、無機酸塩(例：硫酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、リン酸塩、炭酸塩、重炭酸塩等)有機カルボン酸塩(例：酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩等)、有機スルホン酸塩(例：メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、カンファースルホン酸塩等)、アミノ酸塩(例：アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等)、四級アミン塩、アルカリ金属塩(例：ナトリウム塩、カリウム塩等)、アルカリ土類金属塩(例：マグネシウム塩、カルシウム塩等)等があげられる。

本発明に係る医薬の有効成分であるメナテトレノンまたはその塩は、無水物であってもよいし、水和物を形成していてもよい。また、メナテトレノンまたはその塩には結晶多形が存在することもあるが同様に限定されず、いずれかの結晶形が単一であってもよいし、結晶形混合物であってもよい。さらに、本発明に用いるメナテトレノンまたはその塩が生体内で分解されて生じる代謝物も本発明の特許請求の範囲に包含される。

本発明において用いるメナテトレノン、公知の方法で製造することができ、代表的な例として、特開昭49-55650号公報に開示される方法によれば容易に製造することができる他、合成メーカーから容易に入手することもできるし、公知の方法に準じて塩にすることもできる。

- 5 また、メナテトレノンはカプセル剤、注射剤等の製剤としても入手できる。

- 本発明に係る医薬は、メナテトレノンをそのまま用いてもよいし、または、公知の薬学的に許容できる担体等（例：賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤、等）、一般に医薬品製剤の原料として用いられる成分を配合して慣用される方法により製剤化してもよい。また、必要に応じて、血流促進剤、殺菌剤、消炎剤、細胞賦活剤、ビタミン類、アミノ酸、保湿剤、角質溶解剤、等の成分を配合してもよい。製剤化の剤形としては、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、被覆錠剤、
- 10 カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、坐剤、注射剤、凍結乾燥剤、軟膏剤、眼軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤、ローション剤等があげられる。

- また、本発明においては、メナテトレノンの投与形態は特に限定されないが、経口的に投与することが好ましい。メナテトレノンのカプセル
- 20 剤は商品名ケイツーカプセル（エーザイ株式会社製）として、またシロップ剤は商品名ケイツーシロップ（エーザイ株式会社製）として入手することができる。

- 本発明に係るメナテトレノン含有医薬は、哺乳類（例：ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ウマ、サル等）の肝疾患治療・予防に有用で、特に、ヒトの肝疾患の治療・予防に有用である。メナテ
- 25 レノンの好ましい投与量としては通常は10～100mg/日であり、

更に好ましくは30～60mg/日である。

【実施例】

以下に本発明の実施例を挙げるが、これらは例示的なものであって、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は、以下に示す実施例のみならず本特許請求の範囲に様々な変更を加えて実施することが可能であり、かかる変更も本特許請求の範囲に包含される。

〔ビタミンK2による肝癌細胞増殖抑制〕

代表的な肝癌細胞株である HepG2 を用いた系に、MK-4（ビタミンK2）を 2×10^{-5} 、 6×10^{-5} 、 8×10^{-5} 、 10×10^{-5} M の各濃度になるように添加し、経時的に細胞増殖の程度をMTT assay（MTTアッセイ）で測定した。

図1は、肝癌細胞の増殖抑制に対するビタミンK2添加の効果を示したグラフである。図1に示すように、ビタミンK2添加後1日目、2日目では細胞増殖の程度にそれほど変化は認められなかったが、3日目、5日目になると、ビタミンK2濃度に依存して生細胞の数が抑制された。また、図1に示す結果から、ビタミンK2の HepG2 細胞増殖50%抑制濃度は、約 5×10^{-5} M であると考えられる。

次に、この肝癌細胞増殖抑制作用が、細胞周期のどのステージで効果を発揮しているのかを調べるため、MK-4を 5×10^{-5} M の濃度になるように添加した後5日間経過した HepG2 細胞を、核染色して、FACS（fluorescence-activated cell sorter；蛍光標示式細胞分取器）で細胞周期を測定した。図2にチャートを示すように、G1期及びG2/M期の細胞分画が増え、S期（DNA合成期）の細胞分画が相対的に減少していることが分かった。これより、主に細胞周期の停止が細胞増殖抑制につながっていることが分かった。

〔ビタミンK2による肝癌細胞浸潤能の抑制〕

次に、ビタミンK₂が細胞の浸潤能に与える影響を、HepG2細胞とマトリゲルチャンバーを用いた invasion assay で検討した。すなわち、小さな孔のあいたゲルの上層に細胞をまき、下層に走化性因子を含んだ培養液を入れ、細胞が上層から下層に浸潤する数を数えることで、浸潤能を判定した。その際に、上層の培養液中にMK-4（ビタミンK₂）をOM, 4×10^{-5} M, 8×10^{-5} M の濃度になるように添加し、まだ細胞増殖に影響のない24時間経過後に下層に出てきた細胞を染色し、その数を数えることで浸潤能に与える影響を検討した。図3に各濃度におけるゲル写真を示すように、ビタミンK₂は濃度依存的に癌細胞の浸潤を抑制した。

以上の結果より、ビタミンK₂は肝癌細胞の増殖に関わるだけでなく細胞の浸潤能を抑制する作用も有することが分かった。

〔ビタミンK₂による細胞の遺伝子発現への影響〕

ビタミンK₂添加による細胞の遺伝子発現への影響を cDNA microarray (cDNA マイクロアレイ) を用いて検討した。

HepG2細胞にMK-4（ビタミンK₂）を 5×10^{-5} M の濃度になるように添加した後、HepG2細胞を4日後に回収しRNAを抽出し、次いでこれをラベルした。次に、これを、肝臓や胃組織から抽出した cDNA を約4300種類搭載した in-house の cDNA microarray を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した（図4（b））。

図4（a）は、横軸にビタミンK₂非添加細胞（コントロール）を、縦軸にMK-4添加細胞を Scatterplot した遺伝子発現プロファイルである。図4（a）において、縦軸及び横軸はいずれもシグナル強度（log scale）を示し、赤い点（図4（a）中におけるR部分）は2倍以上あるいは0.5倍以下の発現変化を示した遺伝子を示す。図4（a）に示すように、2倍以上あるいは0.5倍以下の遺伝子発現量変化を示した遺

伝子は約 10 % 弱に認められた。特に、細胞接着因子(Fibronectin, Desmoplakin, Integrin beta 1, Cell adhesion molecule (CD44), Integrin alpha X, Integrin beta 2, Integrin alpha M, Fibromodulin)、アポトーシス関連遺伝子(GADD34)、細胞周期関連遺伝子(Cyclin E, Cyclin G)などの遺伝子発現量に変化が認められた。このようなMK-4 5 添加による遺伝子発現変化が、細胞増殖抑制や浸潤転移抑制につながるものと考えられる。

また、HepG2 細胞の一部(Fibromodulin, GADD34, Fibronectin, Progression Associated Protein, CyclinG, CD44, CyclinE)について、R 10 T-PCRにより発現量変化を確認した(図5)。

さらに、図6に示すように、MK-4を添加後1日目、2日目、3日目と経時的に遺伝子変化を解析した。図6は縦方向に今回検討した約 4300 遺伝子をならべて、非添加細胞に比べて down regulation (ダウンレギュレーション) している遺伝子を緑(図6中におけるG部分)、up 15 regulation (アップレギュレーション) している遺伝子を赤(図6中におけるR部分)で描画したものである。図6に示すように、時間が経過するにつれて遺伝子の発現が変化することが明らかとなった。

図7に、上記の遺伝子発現の経時的な変化に基づいて遺伝子ネットワークを描出した図を示す。図7に示すこれらの遺伝子は発現変化を共に 20 しているものであり、遺伝子発現の制御が近似しているものと考えられる。

次に、MK-4が遺伝子発現に変化を及ぼすことを蛋白レベルで確認した。HepG2 細胞にMK-4を $5 \times 10^{-5} \text{M}$ になるように添加し、細胞を4日後に回収し蛋白を抽出、二次元電気泳動後、銀染色を行った。図 25 8にその結果を示すように、MK-4の添加細胞と非添加細胞との間では、蛋白レベルでも遺伝子発現に違いが見られることが確認された。

以上の結果から、MK-4が細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、MK-4による癌細胞増殖抑制作用や浸潤抑制作用の機序として、これらの遺伝子発現の変化が関係していることが分かった。

5 [ビタミンK2により活性化されるシグナル伝達経路]

ビタミンK2が、どのような経路を介して遺伝子発現を制御しているのかを調べるために、54種(AP1 AP2 ARE Brm3 C/EBP CBF CDP c-Myb AP1 CREB E2F1 EGR ERE Ets PEA3 FAST1 ISRE AP2 GATA GRE HNF4 IRF1 MEF1 MEF2 Myc-Max NF1 CREB NFAT NFE1
10 NFE2 NFkB Oct1 p53 Pax5 Pbx1 EGR Pit1 PPAR PRE RAR RXR SIE SBE Smad3/4 Sp1 SRE Stat1 Stat3 Stat4 Stat5 Stat6 TFIID TR DR4 USF1 VDR HSE MRE)の転写因子の活性化の有無について検討した。

HepG2細胞にMK-4を 5×10^{-5} Mとなるように添加し、最初の変
15 化を同定するために、2時間、12時間という比較的短時間で細胞を回収し、その核抽出物を抽出した。核抽出物と上記の転写因子の結合配列 DNA probe mix とを混合した後、転写因子が結合した probe のみを回収し、それら probe と相補的な配列を搭載したアレイとハイブリダイズさせ転写因子が結合した DNA probe(すなわち活性化された転写因子経路)
20 の量を判定し、その転写因子経路の活性化の程度とした。その結果を図9に示すように、ビタミンK2の添加により、上記54種の経路のうち、AP-2, CREB, USF1の系が活性化されていることが明らかとなった。

さらに、MK-4添加前(0時間)と添加後2, 6, 12, 24, 4
8時間経過後の核抽出物と、AP-2 consensus probe を用いたゲルシフト
25 アッセイを行った。その結果を図10に示すように、添加後にはMK-4添加前に比べてDNAとの蛋白結合が増えていることが分かった。

また、CREB, USF-1 についても同様にゲルシフトアッセイを行ったところ、MK-4 添加前に比べて添加後 2, 6 時間経過後で DNA と蛋白の結合が増えていることが分かった(データは図示せず)。

CREB について、pEGFP-CREB(Clontech)を HepG2 にトランスフェクション(transfection)し、蛍光観察した結果を図 11 に示す。図 11 に示すように、MK-4 添加によって、この蛍光のシグナル(光量)が添加前に比べて経時的に増したことから、CREB が活性化したことが分かった。

以上の結果より、ビタミン K2 の添加により、AP-2, CREB, USF-1 の各転写因子が活性化されることが明らかとなった。

[ビタミン K2 による PKA の活性化]

HepG2 細胞に MK-4 を $5 \times 10^{-5} \text{M}$ となるように添加した後、これを蛍光標識した。この細胞の溶解液に、PKA の基質ペプチドを混合し、これを電気泳動させた。この結果を図 12 に示す。PKA の基質ペプチドはもともとプラス(+)に荷電しており、蛍光標識した PKA の基質ペプチドと細胞の溶解液を混合することにより、細胞内の PKA が活性化されている場合には基質ペプチドをリン酸化する結果、基質をマイナス(-)に荷電させることにより、+極へ移動する。すなわち、リン酸化を受けた場合(すなわち、PKA が活性化されている場合)は+極へ、リン酸化を受けない場合(すなわち、PKA が活性化されていない場合)は一極側へ移動することになる。

図 12 に示すように、MK-4 を添加してから 2 時間経過した時点において、+極へ移動したことから、MK-4 により PKA が活性化されたことが分かった。

[肝癌細胞増殖における PKA 活性の役割]

HepG2 細胞に MK-4 を $5 \times 10^{-5} \text{M}$ となるように添加した後に PK

Aの specific inhibitor (H89) $40\mu\text{M}$ を添加したグループ、H89 だけを
加えたグループ、MK-4 のみを加えたグループ、何も添加しないもの
(コントロール) について、添加後 4 日目に MTT assay を試行し、M
K-4 添加による細胞の増殖を検討した。その結果を図 13 に示す。図
5 13 に示すように、MK-4 及び H89 を添加したグループは、コントロ
ールほどには細胞増殖はしなかったものの、MK-4 単独添加グループ
よりも細胞の数は明らかに増えた。これより、MK-4 添加による細胞
増殖抑制作用を、H89 が一部ではあるもののキャンセル (解除) するこ
とが分かった。

- 10 この結果から、ビタミン K2 添加による肝癌細胞増殖抑制作用は、少
なくとも一部は PKA の活性化を介しているものと考えられる。

[ビタミン K2 による Rho の活性抑制作用]

- 15 Rhotekin-RBD と細胞溶解液を混ぜた後、Rhotekin-RBD を pull down
して結合した Rho 蛋白の量をプロットすることで、Rho 蛋白の活性化に
ビタミン K2 が何らかの関与を持つか検討した。

- Rho 蛋白は活性化されると GTP が結合した GTP-Rho となるが、この
活性化 Rho とは、Rhotekin という蛋白の Rho Binding Domain (RBD)
が高い affinity で結合することが知られている (Ren XD, EMBO J
1999;18:578-85)。Rho は、癌の浸潤転移に重要な役割をしていると考え
20 られている低分子量 G 蛋白である (Clark EA, Nature 2000;406:532-5)。

HepG2 細胞を用いてコントロールと、MK-4 を $5\times 10^{-5}\text{M}$ および
 $10\times 10^{-5}\text{M}$ で添加したもの、 $5\times 10^{-5}\text{M}$ 添加の上に H89 を $40\mu\text{M}$ 加え
たもので、6 時間経過後に細胞を回収し Rho の活性化を検討した結果を
図 14 に示す。

- 25 図 14 に示すように、MK-4 濃度に依存して Rho の活性化は抑制さ
れ、この効果は H89 でキャンセルされた。Rho の活性化を PKA が制御

するという報告がなされており (Faucheux N, Biomaterials 2002;23:2295-301;Manganello JM, J Biol Chem 2002)、今回の結果から、ビタミンK 2は Rho の活性化を抑制しその作用はP K Aを介していることが分かった。

- 5 以上の結果から、ビタミンK 2は、ビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼの補酵素として機能するよりも数倍高い濃度域においてP K Aを活性化し、これにより肝癌細胞の増殖抑制作用、及び浸潤能抑制作用を有し、様々な遺伝子発現を制御することが判明した。

10 産業上の利用可能性

本発明に係るP K A活性調節剤は、癌疾患治療の予防又は治療に有用である。本発明に係るP K A活性化剤によれば、癌細胞増殖抑制及び／又は癌細胞浸潤抑制に有用である。

請求の範囲

1. メナテトレノンまたはその塩を有効成分として含む、P K A 活性調節剤。

5

2. メナテトレノンまたはその塩を有効成分として含む、P K A 活性化剤。

3. メナテトレノンまたはその塩を有効成分とする P K A 活性化剤を含む、癌疾患の予防又は治療剤。

10

4. メナテトレノンまたはその塩を有効成分とする P K A 活性化剤を含む、癌細胞増殖抑制剤。

5. メナテトレノンまたはその塩を有効成分とする P K A 活性化剤を含む、癌細胞浸潤抑制剤。

15

6. 癌疾患の予防又は治療に用いられる、請求項 2 記載の P K A 活性化剤。

20

7. メナテトレノンまたはその塩を有効成分とする P K A 活性化剤を含む、AP-2, CREB, 及び USF-1 の活性化剤。

8. メナテトレノンまたはその塩を有効成分として含む、P K A 活性の変化に由来する疾患の予防又は治療剤。

25

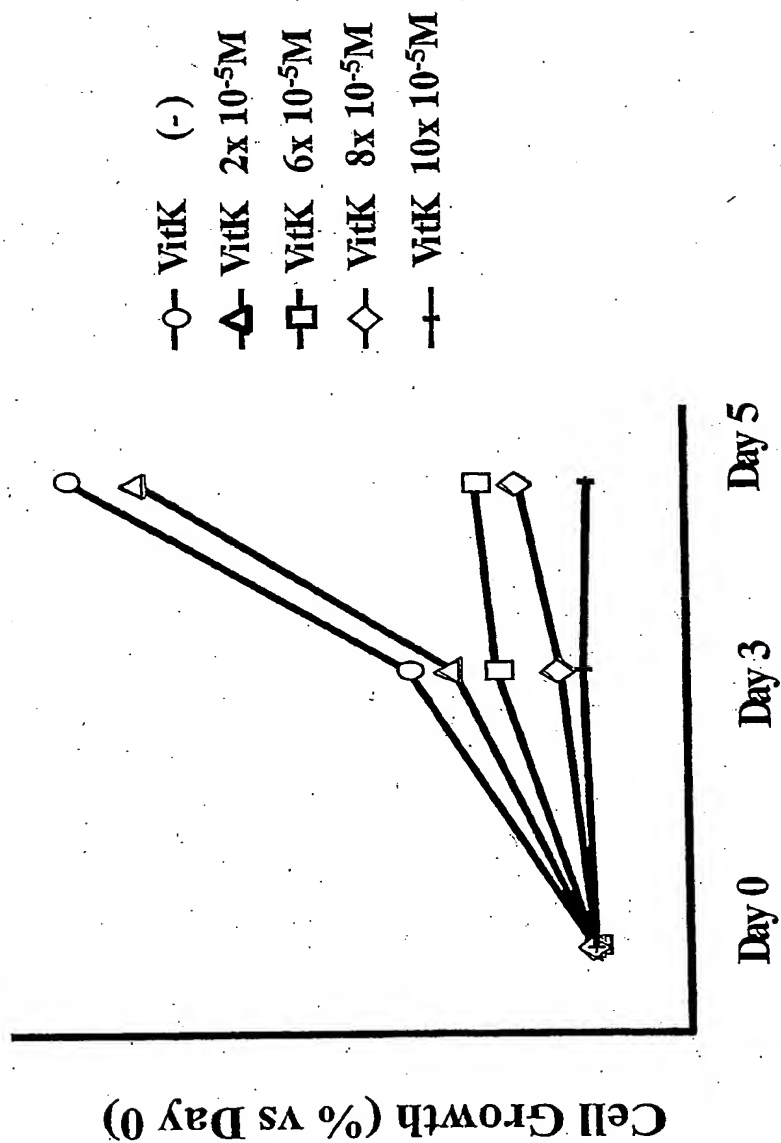
9. メナテトレノンまたはその塩を対象物に有効量投与する工程を含む、PKA活性の調節法。

10. PKA活性化剤の製造のための、メナテトレノンまたはその塩の
5 使用。

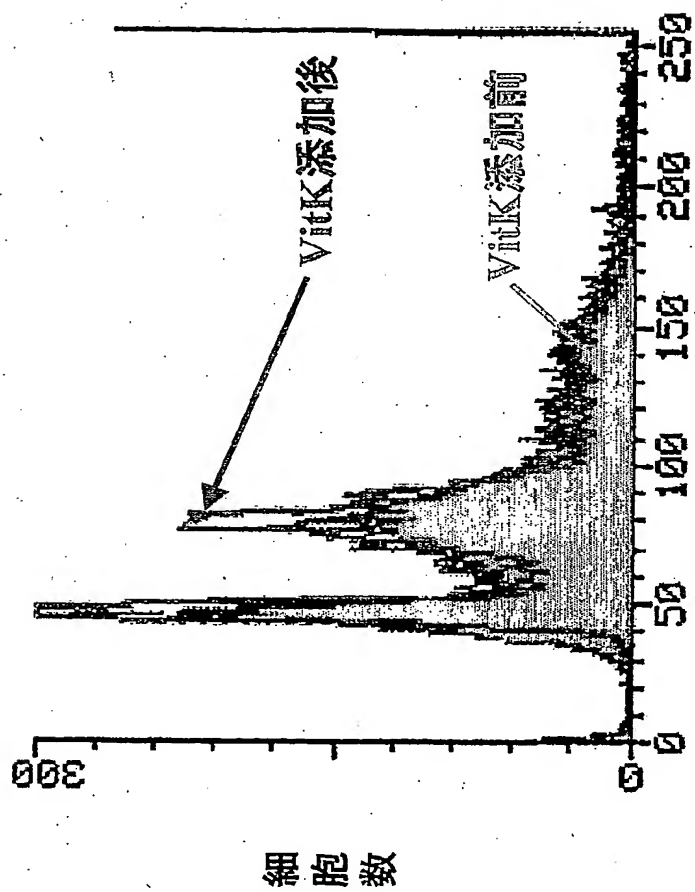
11. メナテトレノンまたはその塩を有効成分とするPKA活性化剤を、癌患者に投与するための医薬品キット。

1/14

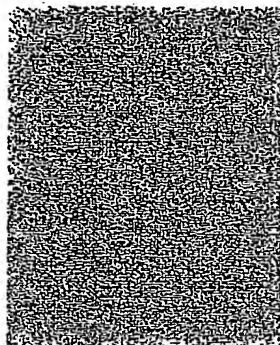
MTT Assay



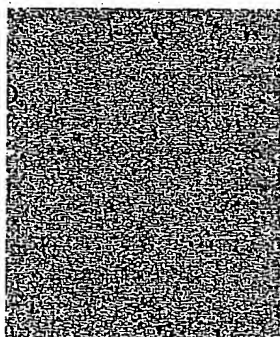
2/14



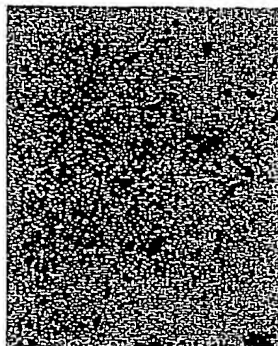
3/14



Vitamin K 8×10^{-5} M



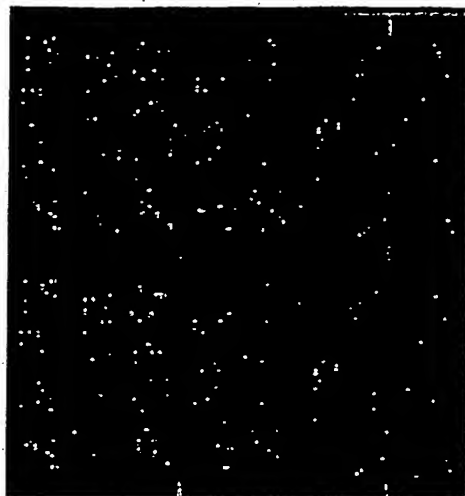
Vitamin K 4×10^{-5} M



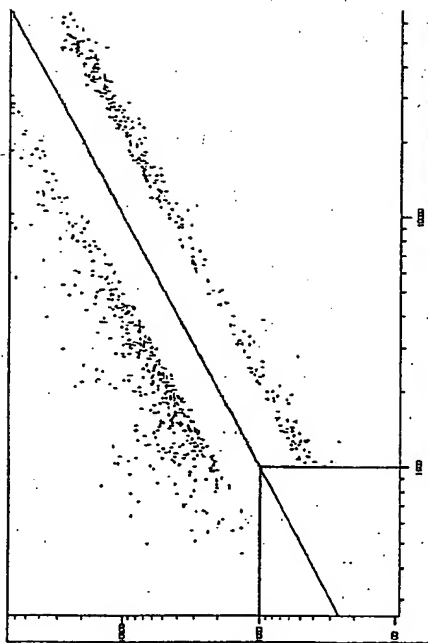
Vitamin K (-)

4/14

(b)



(a)



MK-4 添加

Control

5/14

発現増強

接着分子

Fibronectin
Desmoplakin
Integrin beta 1

発現低下

接着分子

Cell adhesion molecule (CD44)
Integrin alpha X
Integrin beta 2
Integrin alpha M
Fibromodulin

アポトーシス関連

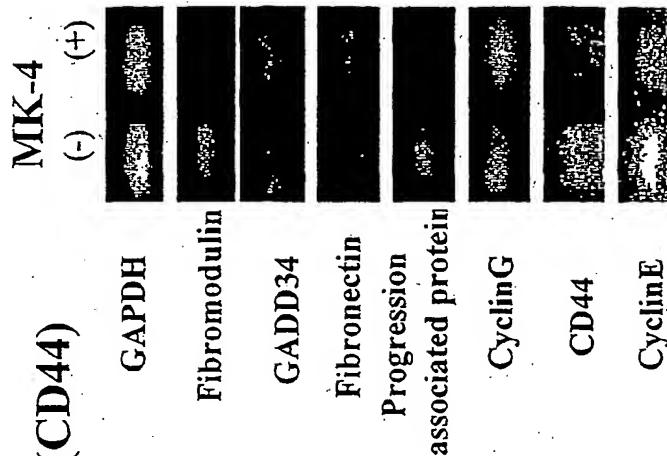
Growth arrest
DNA damage gene
(GADD34)

細胞周期関連

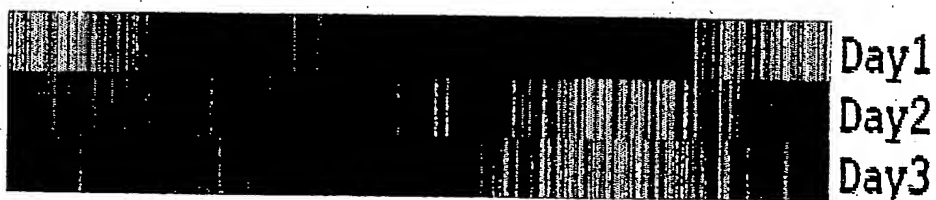
Cyclin E
Cyclin G

細胞運動関連

Myosin light chain kinase



6/14



Best Available Copy

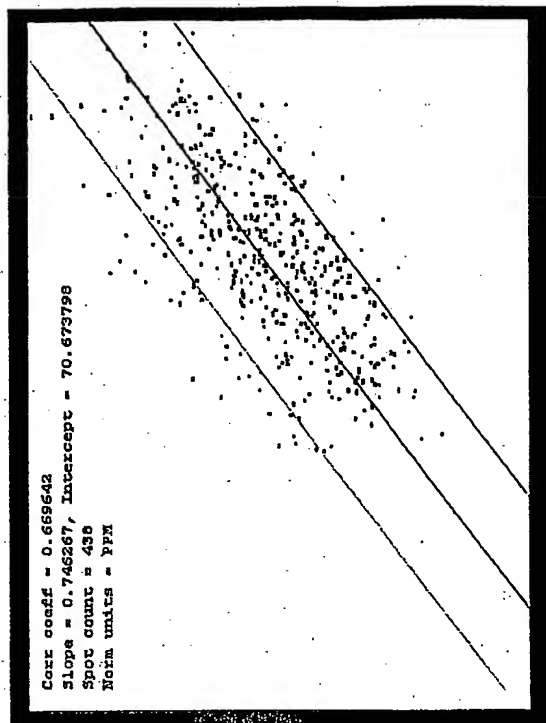
7/14

7

MTCH1	PP3111	MFAP3	AL121924
PBP	AX014100	CHAC	PYCR1
MGC20727	BST2	POR	M58650
MGC15906	AK024840	PCTK1	L12535
AB005624	I08860	KIAA0247	Z97056
C20orf77	AF311912	AF282168	FLJ2181
AA332905	MGC4054	GPAA1	AF211174
NDUFV2	AX011634	APOC3	AK000686
FAH	AX089535	NOSIP	AC012151
CAPZA1	AL162430	U73628	AI418362
VAR2	ZYX	SHOC2	
FLJ20898	X05997	U12391	
SLC25A6	X55741	KIAA0016	
AK001126	AJ012072	AC005070	
AJ277242	AF051976		

8/14

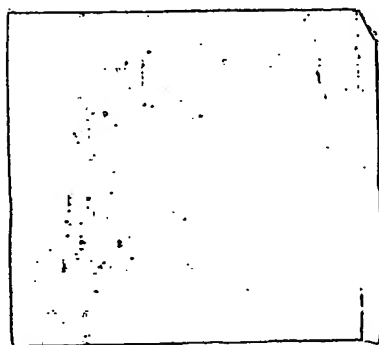
(b)



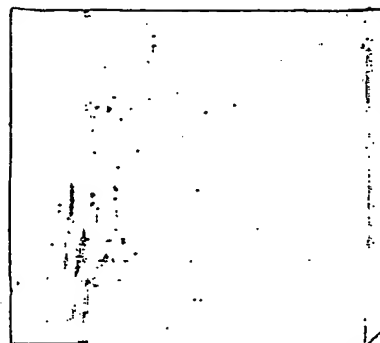
MK-4 (+)

MK-4 (-)

(a)

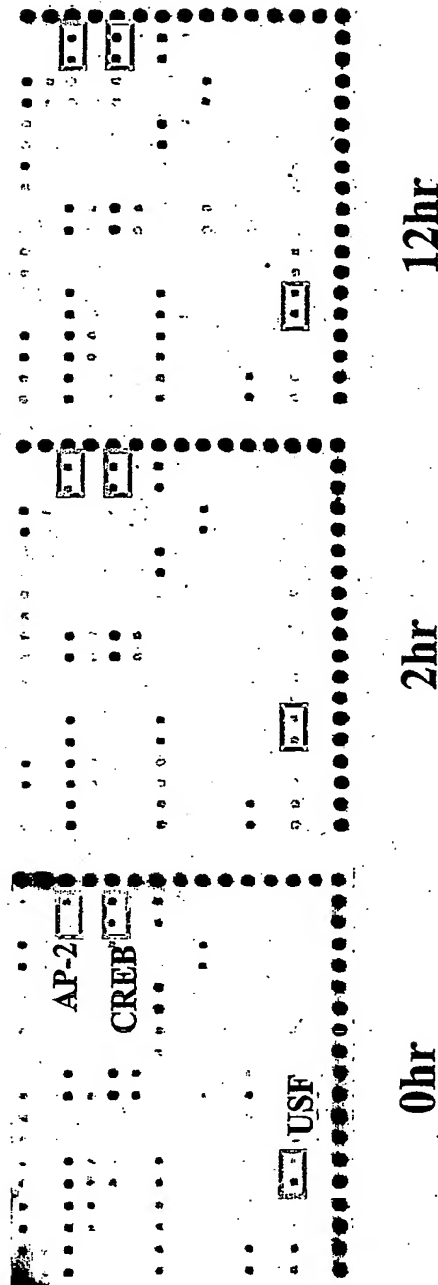


MK-4 (-)



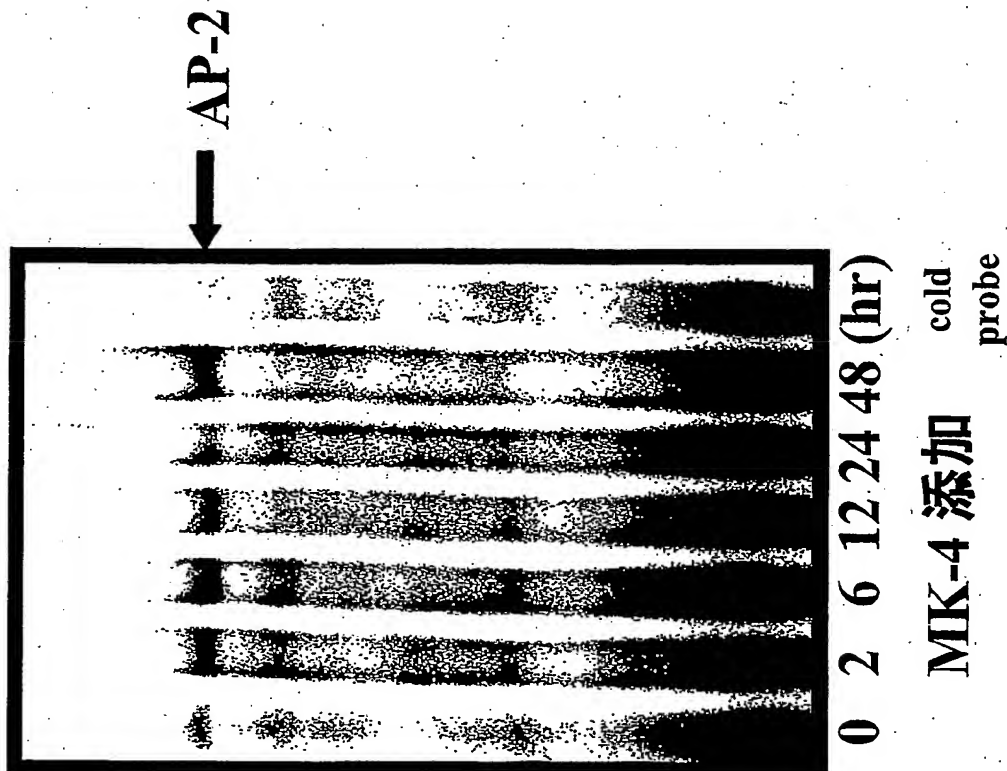
MK-4 (+)

9/14

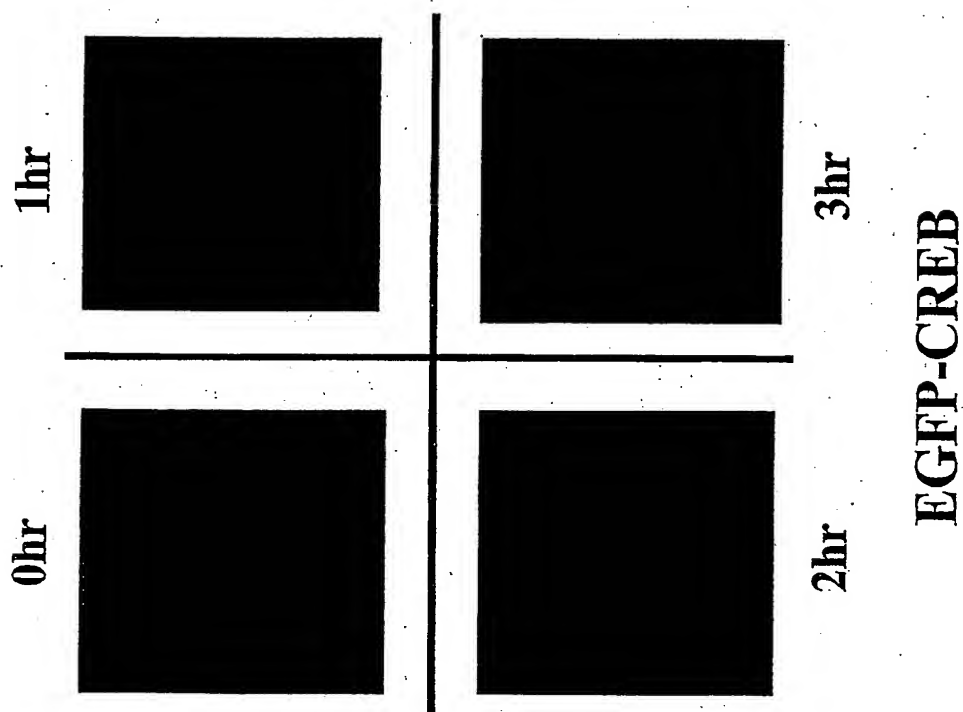


MK-4 添加

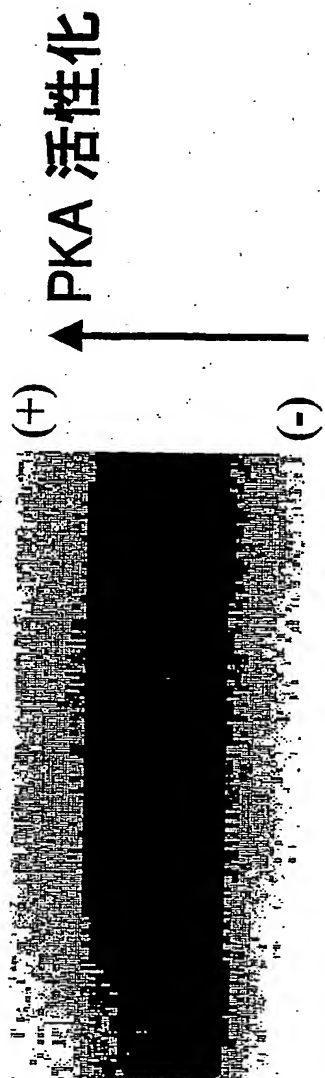
10/14



11/14

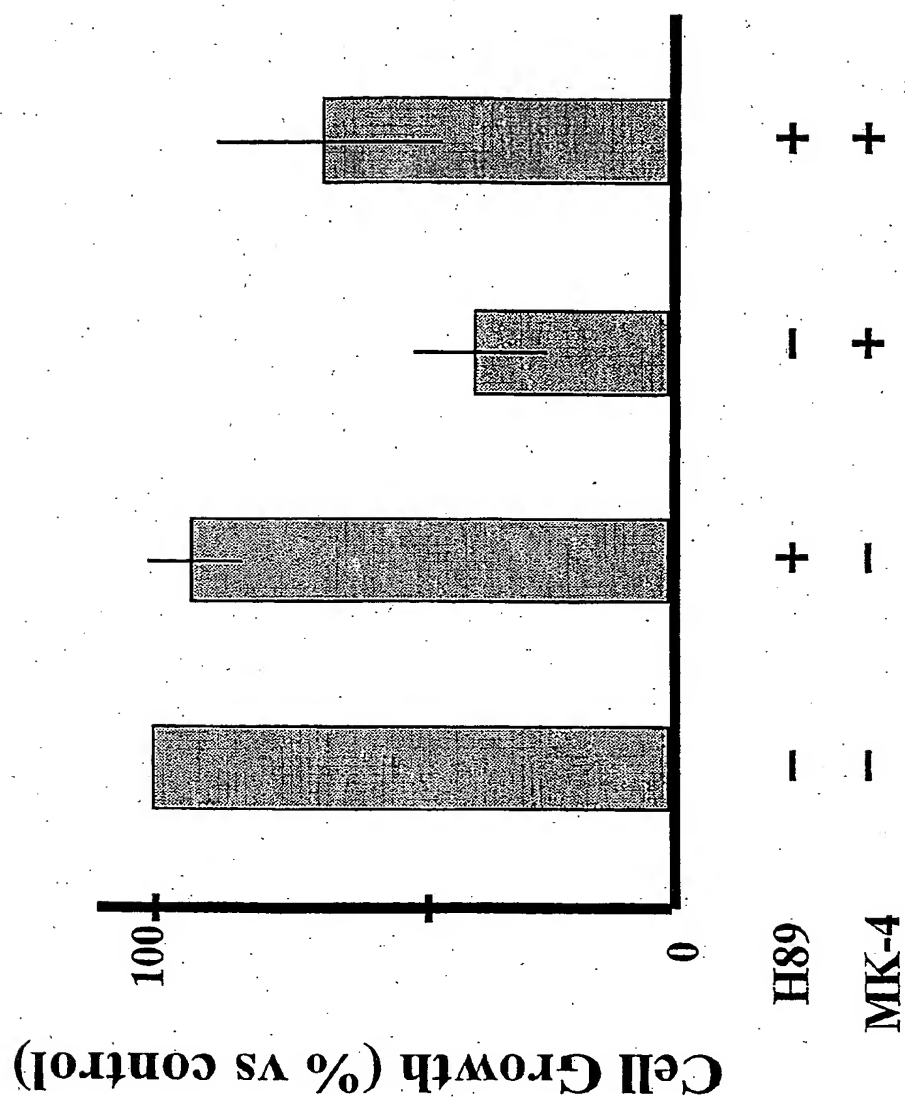


12/14



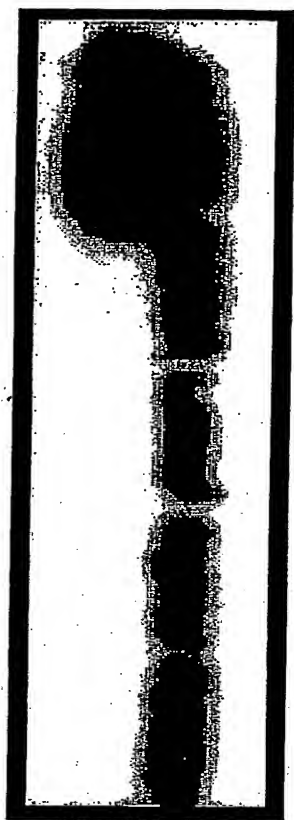
MK-4 添加

13/14



Best Available Copy

14/14



活性型Rho →

MK-4	5x10 ⁻⁵ M	+	-	+	-
MK-4	10x10 ⁻⁵ M	-	+	-	-
H89	40 μM	+	-	-	-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/122, A61P35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/122, A61P35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Medline (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-305955 A (Eisai Co., Ltd.), 01 November, 1994 (01.11.94), Full text (Family: none)	1-8, 10, 11
P, X	WO 03/063850 A1 (Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.), 07 August, 2003 (07.08.03), Full text & JP 2003-226639 A	1-8, 10, 11
X	TSANG, C.K. et al., Novel effect of vitamin K1 (phyllloquinone) and vitamin K2 (menaquinone) on promoting nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells, Neuroscience Letters, 2002, Vol.323, No.1, pages 9 to 12	1-8, 10, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 January, 2004 (28.01.04)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16386

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Brigit A. van Oirschot et al., Protein Kinase A Regulates Expression of p27 ^{kip1} and Cyclin D3 to Suppress Proliferation of Leukemic T Cell Lines, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2001, Vol.276, No.36, pages 33854 to 33860	1-8, 10, 11
A	WO 00/64260 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 02 November, 2000 (02.11.00), Particularly, page 32, line 23 to page 34, line 13 & EP 117306 A1 & JP 2002-542268 A	7
A	US 2002/0165153 A1 (FORSCHUNGSZEM KARLSRUHE GMBH.), 07 November, 2002 (07.11.02), . Particularly, Par. Nos. [0112], [0113] & WO 99/51635 A1 & EP 1068233 A1 & JP 2002-510708 A	7
A	GARCIA, M.A. et al., Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation, FEBS Letters, 1999, Vol.444, No.1, pages 27 to 31	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16386

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

In the invention as set forth in claim 9, PKA activity is regulated and thus the human body is treated. Therefore, it pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16386

Continuation of Box No. I-1 of continuation of first sheet.(1)

under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/122, A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/122, A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Medline (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 6-305955 A (エーザイ株式会社) 1994.11.01、全文 (ファミリーなし)	1-8, 10, 11
PX	WO 03/063850 A1 (久光製薬株式会社) 2003.08.07、 全文 & J P 2003-226639 A	1-8, 10, 11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.01.2004

国際調査報告の発送日

10.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

4C

9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	TSANG, C. K. et al., Novel effect of vitamin K1 (phylloquinone) and vitamin K2 (menaquinone) on promoting nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells, Neuroscience Letters, 2002, Vol. 323, No. 1, pages 9-12	1-8, 10, 11
A	Brigit A. van Oirschot et al., Protein Kinase A Regulates Expression of p27 ^{kip1} and Cyclin D3 to Suppress Proliferation of Leukemic T Cell Lines, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2001, Vol. 276, No. 36, pages 33854-33860	1-8, 10, 11
A	WO 00/64260 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2000.11.02、特に第32頁第23行-第34頁第13行 & EP 117306 A1 & JP 2002-542268 A	7
A	US 2002/0165153 A1 (FORSCHUNGSZEM KARLSRUHE GMBH) 2002.11.07、特に[0112]、[0113] & WO 99/51635 A1 & EP 1068233 A1 & JP 2002-510708 A	7
A	GARCIA, M. A. et al., Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation, FEBS Letters, 1999, Vol. 444, No. 1, pages 27-31	7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲9に記載された発明は、PKA活性の調節を行うことで、結果として人体の治療を行うのであるから、同請求の範囲は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。